



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公開本

(11) 公開編號：TW 201502276 A

(43) 公開日：中華民國 104 (2015) 年 01 月 16 日

(21) 申請案號：102124556

(22) 申請日：中華民國 102 (2013) 年 07 月 09 日

(51) Int. Cl. : C12Q1/68 (2006.01)

(71) 申請人：國立交通大學 (中華民國) NATIONAL CHIAO TUNG UNIVERSITY (TW)
新竹市大學路 1001 號(72) 發明人：黃國華 HUANG, GUE WHA (TW) ; 洪孟燕 HUNG, MENG YEN (TW) ; 陳昱勳
CHEN, YU SHIUN (TW)

(74) 代理人：林火泉

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：20 項 圖式數：6 共 29 頁

(54) 名稱

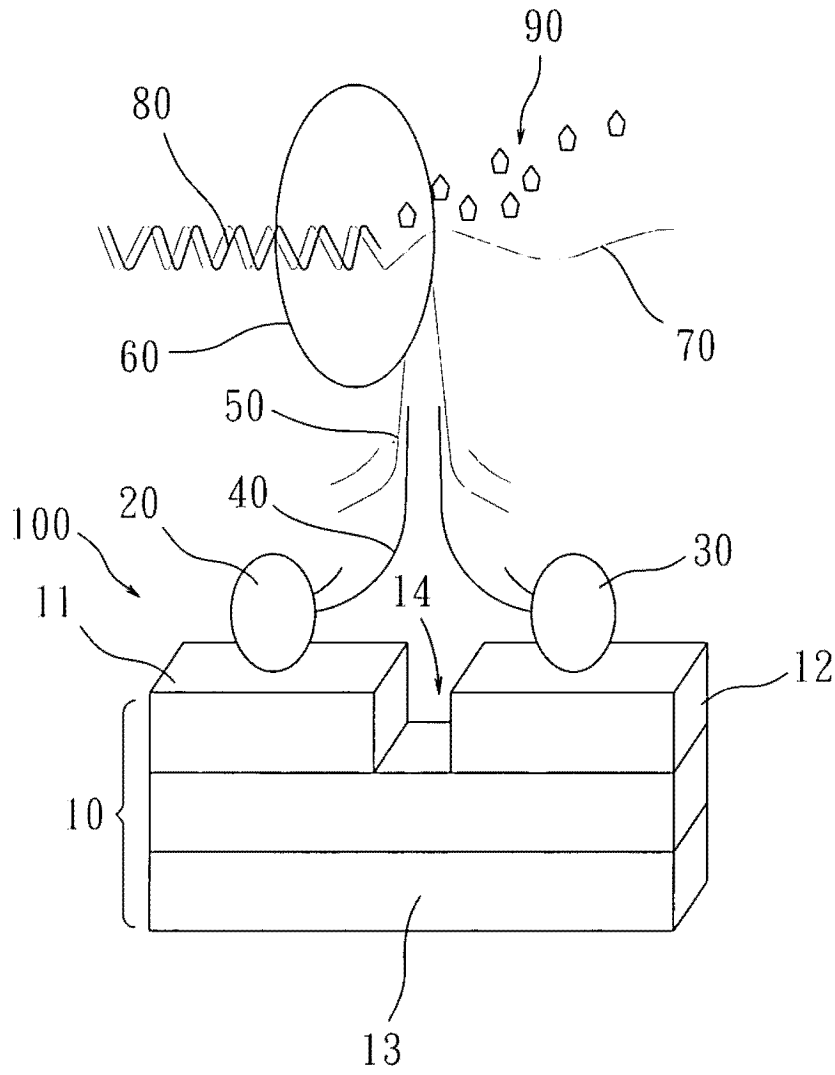
單分子無標定核酸定序方法

SEQUENCING METHOD FOR LABEL-FREE SINGLE MOLECULAR NUCLEIC ACID

(57) 摘要

本發明揭露一種單分子無標定核酸定序方法，是將核酸模板與引子配對，並組裝於聚合酶上，且當核苷酸加入合成時，藉由聚合酶接合於蛋白質電晶體上所測量到的電導訊號，即能判定核酸模板之序列，此測得的電導訊號所構成之軌跡乃包含呈現明顯峰值特性的反應高原，恰可用來判別四種不同的核苷酸與對應的鹼基，並可適用於解碼各種困難的核酸序列。

A sequencing method for label-free single molecular nucleic acid is provided. The primer is used for the nucleic acid template to be assembled to a polymerase. When the nucleotides are added, the electrical conductance signal is measured by the polymerase being connected to the protein transistor to determine the sequences of the nucleic acid template. The trajectory of the measured electrical conductance signal forms a plateaux with obvious spikes, which is used to identify four kinds of the nucleotides and their bases. Furthermore, the sequencing method is suitable for sequencing of complex nucleic acids.



- 10 . . . 電晶體
- 11 . . . 源極
- 12 . . . 汲極
- 13 . . . 閘極
- 14 . . . 奈米通道
- 20、30 . . . 奈米金
粒子
- 40 . . . 第一抗體分
子
- 50 . . . 第二抗體分
子
- 60 . . . 聚合酶
- 70 . . . 核酸模板
- 80 . . . 引子
- 90 . . . 核苷酸
- 100 . . . 蛋白質電晶
體

第 2 圖

201502276

發明摘要

※ 申請案號：102174556

※ 申請日：102.7.09

※IPC 分類：C12 Q 1/68(2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

單分子無標定核酸定序方法 / SEQUENCING METHOD FOR LABEL-FREE SINGLE MOLECULAR NUCLEIC ACID

【中文】

本發明揭露一種單分子無標定核酸定序方法，是將核酸模板與引子配對，並組裝於聚合酶上，且當核苷酸加入合成時，藉由聚合酶接合於蛋白質電晶體上所測量到的電導訊號，即能判定核酸模板之序列，此測得的電導訊號所構成之軌跡乃包含呈現明顯峰值特性的反應高原，恰可用來判別四種不同的核苷酸與對應的鹼基，並可適用於解碼各種困難的核酸序列。

【英文】

A sequencing method for label-free single molecular nucleic acid is provided. The primer is used for the nucleic acid template to be assembled to a polymerase. When the nucleotides are added, the electrical conductance signal is measured by the polymerase being connected to the protein transistor to determine the sequences of the nucleic acid template. The trajectory of the measured electrical conductance signal forms a plateau with obvious spikes, which is used to identify four kinds of the nucleotides and their bases. Furthermore, the sequencing method is suitable for sequencing of complex nucleic acids.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 2 ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

10	電晶體
11	源極
12	汲極
13	閘極
14	奈米通道
20、30	奈米金粒子
40	第一抗體分子
50	第二抗體分子
60	聚合酶
70	核酸模板
80	引子
90	核苷酸
100	蛋白質電晶體

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

單分子無標定核酸定序方法 / SEQUENCING METHOD FOR LABEL-FREE SINGLE MOLECULAR NUCLEIC ACID

【技術領域】

【0001】 本發明係有關一種單分子定序技術，特別是指一種利用導電性測量之單分子無標定核酸定序方法。

【先前技術】

【0002】 個人化醫療的發展指的是從傳統醫療到個人基因資訊的改制，而這樣的演進的關鍵，是需要一種能夠在短時間、低成本內進行準確且高通量的DNA讀序技術。在過去十年中，已經開發了新一代的定序技術，建立在序列擴增DNA標的之陣列反應上，與第一代Sanger定序相比，此方法顯著減少定序的時間，但讀序長度短和高錯誤率限制其進一步地應用在未知基因組上。

【0003】 第三代定序方法(單分子定序技術)不需要擴增、接合或複製，並且，預計將提供單分子的分辨率，延長定序的長度以及大幅降低錯誤率，同時減少成本。這類方法通常涉及到使用光學成像監控螢光物的循環反應，例如，用於定序M13病毒基因序列。

【0004】 另一種第三代定序方法是奈米孔洞測序，採用一種特殊的蛋白質在薄膜結構上打出奈米級孔洞，在外加電壓下，將DNA分子拉進奈米孔洞，當DNA的化學鹼基通過時，引起細微的電流變化，測量這種變化即可識別出不同的鹼基(T、C、G和A)組成順序。此方法已被用來解碼包含單

一核苷酸之DNA序列，其使用 ϕ 29 DNA聚合酶，並通過MspA奈米孔洞來控制DNA的轉換率。此外，Oxford奈米孔洞技術，據說也採用奈米孔洞設備原型，將一個完整的DNA鏈通過在一個單一的病毒基因組來進行解碼。

【0005】 然而，商業化的第三代定序技術的性能，是目前唯一能媲美下一代的測序方法，但其短讀長和高錯誤率的問題仍有待解決。

【發明內容】

【0006】 有鑑於此，本發明的主要目的在於提供一種單分子無標定核酸定序方法，將未標定的核苷酸配對於核酸模板，並組裝於聚合酶上，經量測聚合酶的電導性就能夠為核酸分子讀出序列。此方法不僅適用於不同的聚合酶，並可用以解碼各種困難的核酸序列，更具有極高的準確性。

【0007】 為達上述之目的，本發明提供一種單分子無標定核酸定序方法，其步驟是藉由提供一蛋白質電晶體，此蛋白質電晶體包含二電極與至少二奈米金粒子，其中，二奈米金粒子分別結合於二電極，且藉由施加偏壓於二電極上，使得第一抗體分子自組裝結合至二奈米金粒子上，並且，將聚合酶連接於第一抗體分子上，然後，導入核酸模板，將引子配對於核酸模板上，並組裝在聚合酶上，然後，加入一種或多種未標定的核苷酸，以與聚合酶發生反應，並合成互補核酸，同時，通過蛋白質電晶體來同步檢測聚合酶反應時的電導訊號，以取得電訊圖譜，最後，則根據電訊圖譜，來判定核酸模板之序列。

【0008】 本發明中，聚合酶的電導訊號是藉由連接上的蛋白質電晶體來檢測，聚合酶可先接合於第二抗體分子，再鍵結於第一抗體分子上，或者，直接連接於第一抗體分子，再接上兩個金奈米粒子，最後接在蛋白質

電晶體的源極和汲極。核苷酸加入後，聚合酶展現的電導訊號所形成之軌跡（即，電訊圖譜）具有極容易辨認的高為3~6pA的反應高原。每個反應高原的出現恰與一個鹼基的讀取一致，大約每秒可以讀22個核苷酸。反應高原上的尖峰具有明顯的峰值特性，恰可用來分辨四種不同的核苷酸。另外，本發明也可配合不同種類的聚合酶來讀序，也可讀出像是均聚合物（homopolymers）此類困難的序列。此外，亦可將多組自組裝的蛋白質電晶體建構在同一晶片上，將可以同時對於多個核酸模板進行定序。

【0009】 底下藉由具體實施例詳加說明，當更容易瞭解本發明之目的、技術內容、特點及其所達成之功效。

【圖式簡單說明】

【0010】

第1圖，為本發明所提供之單分子無標定核酸定序方法之流程圖。

第2圖，為本發明利用蛋白質電晶體進行單分子無標定核酸定序之系統示意圖。

第3a圖，為本發明利用 $\Phi 29$ DNA聚合酶接合於蛋白質電晶體並進行合成反應過程中所取得的電訊圖譜。

第3a-1圖~第3a-3圖，分別為根據第3a圖之部分電訊圖譜1~3的放大圖。

第3b圖~第3c圖，分別為本發明利用 $\Phi 29$ DNA聚合酶所讀出的攜帶重複GATC序列之核酸模板和攜帶重複TTCCGGAA序列之核酸模板的電訊圖譜；鹼基名稱標示在每個反應高原下方。

第4a圖~第4d圖，分別為G、T、A和C鹼基之反應高原的基本圖形。

第5a圖～第5d圖，分別為由 ϕ 29 DNA聚合酶 (ϕ 29)、T4 DNA聚合酶 (T4)、T7 DNA聚合酶 (T7) 和大腸桿菌的DNA聚合酶I (Pol I) 定序Oligo3之核酸模板來得到之電訊圖譜。

第6圖，為由 ϕ 29DNA聚合酶所定序出之帶有均聚合物 (homopolymer) 之核酸模板的電訊圖譜。

【實施方式】

【0011】 本發明提供一種單分子無標定核酸定序方法，乃藉由聚合酶將未標定的核苷酸配對於核酸模板上，經由電導訊號的檢測就能實現單一核酸分子的序列判斷，其包含判斷DNA或RNA單分子。請參照「第1圖」，說明本發明單分子無標定核酸定序方法之流程圖，包含有下列步驟：

【0012】 如步驟S10，提供一種可提供穩定的電導讀數之蛋白質電晶體，被設計用來抓取一個聚合酶，用以合成新的鏈。

【0013】 關於蛋白質電晶體裝置的具體範例，請參照「第2圖」，蛋白質電晶體100可包含電晶體10和至少二奈米金粒子20、30，其中電晶體具有源極11、汲極12和閘極13，並可利用電子束微影技術，在50奈米寬的源極11和汲極12之間，製造出約10奈米的奈米通道14，且二奈米金粒子20、30（直徑為5奈米）是利用原子力顯微鏡的尖端被帶到並結合於源極11和汲極12的邊緣上，將聚二甲基矽氧烷 (polydimethylsiloxane, PDMS) 覆蓋在帶電的奈米金粒子20、30外，以提供一個預成型的液體通道（寬100奈米、深20奈米）來保護元件免受物理性損壞。在此，第一抗體分子40可為免疫球蛋白，其透過液體通道以每秒0.1 μ l的流速將每毫升1 pg的免疫球蛋白傳送出來。然後，藉著在閘極13上施加偏壓以提供給源極11和汲極12，使得第一

抗體分子40可通過奈米通道自組裝結合於二奈米金粒子20、30上。

【0014】 再者，如步驟S20，將聚合酶60先接合於第二抗體分子50，再鍵結於第一抗體分子40上，或者，聚合酶60可直接連接於第一抗體分子40上。而第二抗體分子50亦可為免疫球蛋白。聚合酶60，譬如可選用DNA聚合酶，是一種催化DNA合成的一種酵素，可為 ϕ 29 DNA聚合酶、T4 DNA聚合酶、T7 DNA聚合酶和DNA聚合酶I。

【0015】 進一步以 Φ 29 DNA聚合酶為例， Φ 29 DNA聚合酶60是一個複製型的聚合酶，具有較長合成能力和較低錯誤率。將 Φ 29 DNA聚合酶60化學性交聯修飾到第二抗體分子50上，第二抗體分子50連接到蛋白質電晶體100上第一抗體分子40的Fc結構域，而第一抗體分子40結合到源極11和汲極12上的奈米金粒子20、30，其逐步自組裝的過程可藉由導電性來監測（有關本發明導電性之監測過程，容後詳述）。

【0016】 跟著，如步驟S30，導入核酸模板70，將引子80配對於核酸模板70上，並組裝在聚合酶60上。本發明所採用之核酸模板70可為單鏈DNA（ssDNA）、雙鏈DNA（dsDNA）或RNA。

【0017】 如步驟S40，加入一種或多種未標定的核苷酸90，來與聚合酶60發生反應，並合成互補核酸。本發明中，未標定的核苷酸90為脫氧核糖核苷三磷酸（dNTP），其包含dTTP、dATP、dCTP和dGTP。在反應的過程，基於和核酸模板70互補的核苷酸90（dNTP）選擇鹼基配對，形成磷酸二酯鍵結於引子80的3'-OH，並釋放出焦磷酸。在從核酸模板70游離前，DNA聚合酶60沿著核酸模板70前進時鏈會拉長。核苷酸90（dNTP）和DNA聚合酶60的交互作用，具有經典的Michaelis-Menten機制，包含基質結合（鹼基

配對)和鍵結形成步驟。

【0018】 如步驟S50，隨著步驟S40之反應過程，於核苷酸90參入合成時，同步檢測源極11和汲極12之間的電導訊號，而可得知聚合酶60的導電性變化，並藉以取得聚合酶60之電訊圖譜。

【0019】 最後，如步驟S60，根據電訊圖譜的圖形，來判定核酸模板70之序列。

【0020】 有關本發明如何進行電導訊號之檢測，及根據聚合酶的電訊圖譜來實現單分子無標定核酸之定序，詳細的實驗情形說明如后。

【0021】 本發明係利用蛋白質電晶體來監控聚合酶的導電性變化以及確認不同的鹼基。請配合「第3a圖」之電訊圖譜，其顯示 Φ 29 DNA聚合酶接合於蛋白質電晶體並進行反應的各步驟流程及所對應的電導訊號。本發明中，藉著在閘極上施加偏壓，當一個穩定的源極-汲極電流 (ISD) 被檢測出來時，即表示第一抗體分子 (免疫球蛋白) 可成功地通過奈米通道自組裝結合於二奈米金粒子上；由圖中顯示蛋白質電晶體的最初電導訊號約略為43 pA。

【0022】 接著，由管柱層析法純化出的 Φ 29 DNA聚合酶共軛物被帶到蛋白質電晶體，並接合到蛋白質電晶體之第一抗體分子的Fc端。當源極-汲極 (VSD) 電壓為9.0 V和閘極 (VG) 電壓為3.0 V時， Φ 29 DNA聚合酶共軛物的接合會導致不可逆的電流增加，電流約增加60 pA，同時，會在電訊圖譜上形成一個突起的電導訊號，此電導訊號最後較安定的數值為102 pA，雜訊約5 pA。

【0023】 值得注意的是，為了獲得pA級的電導訊號時，所有的測量

皆是在電波隔離室中進行，以減少電磁干擾和射頻干擾，並且，爲了減少訊號的衰減，使用超導體材料於電晶體和訊號輸出端點之探針間的介面。再者，爲了測量動態的電導訊號，將可藉由輸入高頻雷射脈衝至蛋白質電晶體的量子點上，並且測量由光子誘發波動之電導訊號。透過高保真電導訊號之偵測頻率爲 $1.7 \times 10^9 \text{ s}^{-1}$ 的雷射波形，表示本方法能夠提供毫微秒（subnanosecond）的動態回應。 $\Phi 29$ DNA聚合酶的轉換率（turnover rate）範圍爲從每秒20個核酸到150個核酸，且此檢測序列反應發生在毫秒級內。因此，在測量過程中將時間倉設定爲1微毫秒。

【0024】 透過監測聚合酶的導電性變化，可以得知4種不同的鹼基種類及鹼基加入的排列順序。攜帶GATC重複序列之核酸模板會與互補的引子結合，並接上被蛋白質電晶體固定住的 $\Phi 29$ DNA聚合酶，等待足夠的時間，就會將電導訊號之波動穩定下來，雜訊也會降爲1 pA（第3a-1圖）。然後，加入 $1 \mu\text{M}$ 的dNTPs，來合成互補DNA聚合酶鏈。隨著dNTPs的加入，就觸發了酵素反應。此聚合過程所產生的導電性變化乃爲判定核酸序列的重要關鍵。受質dNTPs與聚合酶的可逆性結合，顯現在一開始的電訊圖譜，形成了隨機突起的尖峰（第3a-2圖），這些尖峰高約 $1.5 \sim 3$ pA，可能是由聚合酶與核苷酸的快速結合和分離所致。緊接著出現的電導訊息，是呈現數個分離良好的反應高原，反應高原之高度約 $3 \sim 6$ pA（第3a-3圖）。反應高原的形狀可以被用來識別某階段持續性的聚合酶與受質dNTPs的結合、催化反應和焦磷酸的釋放。反應高原的順序出現，代表著在成形的核苷酸鏈中鹼基依序的配對以及核苷酸逐步的併入。反應高原的形成速率是約 22 nt s^{-1} ，這與 $\Phi 29$ DNA聚合酶在 25°C 時的轉換率符合。DNA複製是由互補序列的持續填入來

形成，直到核酸模板的衰減。而電訊圖譜也會在聚合酶合成完雙股DNA後降回原本的無活化階層。

【0025】 由於核苷酸的結合會促進Φ29 DNA聚合酶的活性位置產生導電性。隨著結合鍵的形成、焦磷酸的釋放、向下滑動的雙鏈DNA、以及活性位點疏散（創造空間給下一個核苷酸），之後是核苷酸和聚合酶之間的結合。一個完整的反應週期會在電導圖譜中呈現一個反應高原的軌跡。四種核苷酸之反應高原的區別在於它們所呈現的峰值特性。請參見「第3b圖」和「第3c圖」，以攜帶重複GATC序列之核酸模板和攜帶重複TTCCGGAA序列之核酸模板的電訊圖譜為例。首先來說，G鹼基、T鹼基和A鹼基的反應高原展現了單一尖峰，而C鹼基的反應高原則是會出現多重的尖峰。尖峰的高度約為5~6 pA，而尖峰的出現是由於電導訊號的突然增加或減少，表示靜電組成發生暫時性改變。

【0026】 本發明藉由統計超過五萬個反應高原的圖形數據，且經過歸納分析而得出以下結果。在此，係從原始資料中隨機挑選「第4a圖~第4d圖」為例，分別代表G、T、A和C鹼基之反應高原的基本圖形，一個基本圖形包含了反應高原的升起後到達第一個或第二個波峰的這段時間（即tsp1和tsp2）之電導訊號。由結果得知，G鹼基之反應高原在升起後到達尖峰之波峰的時間（tsp1）為 3.1 ± 0.13 毫秒，T鹼基之反應高原在升起後到達尖峰之波峰的時間（tsp1）為 9.3 ± 0.11 毫秒，A鹼基之反應高原在升起後到達尖峰之波峰的時間（tsp1）為 13.1 ± 0.14 毫秒，C鹼基之反應高原在升起後到達第一個尖峰之波峰的時間（tsp2）為 5.2 ± 0.15 毫秒，且C鹼基之反應高原在升起後到達第二個尖峰之波峰的時間（tsp2）為 12.2 ± 0.12 毫秒。尖峰的模式似乎無

關於氫鍵數或核苷的化學成分。又，藉由反應高原的寬度 (τ_0) 可用來分辨嘧啶 (T鹼基和C鹼基) 和嘌呤 (G鹼基和A鹼基)，且嘧啶 (T鹼基和C鹼基) 係長於嘌呤 (G鹼基和A鹼基)；其中，G鹼基之反應高原的寬度 (τ_0) 為 22.3 ± 2.4 毫秒，T鹼基之反應高原的寬度 (τ_0) 為 29.5 ± 2.2 毫秒，A鹼基之反應高原的寬度 (τ_0) 為 20.3 ± 2.1 毫秒，C鹼基之反應高原的寬度 (τ_0) 則為 30.2 ± 2.3 毫秒。而反應高原之寬度 (τ_0) 的集中分佈表明聚合酶的催化活性是不變且非隨機的。

【0027】 另外，本發明之鹼基判讀 (Base-calling) 是利用一次只給一種類型的核苷酸來予以驗證，可得知導電性的特質只出現在給予相對應的核苷酸。也就是說，反應高原只有在正確的基質和聚合酶的活化位反應後才會出現。舉例說明，當合成G鹼基的時候，注入dGTP會促進反應高原產生。當G嵌入反應結束，聚合酶移位後，dGTP不再是正確的基質。此時再加入dGTP將不再有反應高原產生。此外，如果透過雙脫氧核苷酸終止聚合反應後，隨後再加入dNTP，電訊圖譜只會出現結合突起 (binding spikes)，而不會出現反應高原。此定序反應所提供的核苷酸為dGTP、dATP和dTTP三種混合。並且，根據隨機混合數種核酸模板，並和常見引子黏合後，利用 $\phi 29$ DNA聚合酶組裝於蛋白質電晶體所進行的定序反應結果，也表現了鹼基判讀的準確性。從反應高原的形態分析，從反應高原的一開始延伸到超過90%之軌跡圖形係達到了一致性的認同。反應高原寬度以及形狀的變化經常出現在反應高原的尾端，而這出現在A鹼基和C鹼基的最後尖峰值之後。這些結果說明，通過監測在合成過程中一個不斷增長的DNA聚合酶鏈的導電性，確實可以實現單分子測序的目的。

【0028】 本發明針對核苷酸之間的關聯和其相對應的反應平原形狀，係藉由檢測其他DNA聚合酶的電訊圖譜作進一步探討。

【0029】 請參照「第5a圖～第5d圖」，這些電訊圖譜是由 ϕ 29 DNA聚合酶（ ϕ 29）、T4 DNA聚合酶（T4）、T7 DNA聚合酶（T7）和大腸桿菌的DNA聚合酶I（Pol I）定序Oligo3之核酸模板來得到，Oligo3核酸模板的序列為5'-aagaagttacgattgcgcggtctcagaatgaacattcagagaatcataactaacaccagaaaccagt acataggccacagcgttcttcaacgccggtacgaattactccccattgaaga cgccgaggagccaag-3'。請參見「表一」，從 ϕ 29、T4、T7 DNA聚合酶和DNA聚合酶I得到的反應平原之高度和寬度有著高度的相似性，只有輕微的差異性，核苷酸G、T、A、C對應的反應高原形狀依然分辨的出來。各種聚合酶的核苷酸對應的反應高原顯示出鹼基配對的分子機制和鍵結形成都是聚合酶的共同特點。在具有足夠進行DNA定序的反應平原形狀的條件下， ϕ 29、T4、T7 DNA聚合酶擁有固定的長的合成能力以及低的錯誤率，能夠成為基因體解碼的最佳選項。

【0030】 表一

聚合酶	反應高原之高度Hr (pA)				反應高原之寬度 τ_0 (ms)			
	核苷酸G	核苷酸T	核苷酸A	核苷酸C	核苷酸G	核苷酸T	核苷酸A	核苷酸C
ϕ 29	3.1±0.41	3.01±0.41	3.0±0.43	3.1±0.42	22.3±2.4	29.5±2.2	20.3±2.1	30.2±2.3
T4	3.2±0.42	3.2±0.58	3.1±0.43	3.3±0.54	22.2±2.5	29.2±2.4	20.1±2.3	30.5±2.2
T7	3.3±0.42	3.6±0.43	3.1±0.4	3.7±0.41	23.1±2.3	26.4±2.3	19.2±2.1	28.3±2.2
Pol I	3.4±0.8	3.7±0.68	3.2±0.72	3.8±0.67	20.1±2.4	25.4±2.4	26.2±2.3	33.2±2.6

【0031】 另外，具有同一種的單一核苷酸之核酸模板通常被認為是難以被定序的，而這種核酸模板在許多定序技術中有很高頻率的讀取錯誤。

本發明中，更使用 ϕ 29 DNA聚合酶來定序一段含有20個連續的T鹼基，請參照「第6圖」，這些帶有均聚合物（homopolymer）之核酸模板的電訊圖譜是由 ϕ 29 DNA聚合酶所定出的，由5端到3端的解碼是 (t) 20 cttggctccgcgggcg。結果顯示，本發明確實能夠解決20個連續的T鹼基定序，而且沒有引起歧異的讀取。

【0032】 本發明所測得的電訊圖譜之軌跡與之前研究的DNA聚合酶及單分子酵素動力學是一致的。Michaelis–Menten機制提出藉由催化以及產物釋出形成的酵素-受質複合物發生之前是一種可逆的結合步驟。這個機制在觀察結合的尖峰和反應高原組別時被證實（第3a-2圖和第3a-3圖）。尖峰代表受質可逆性的結合，對應的是快速增加或降低電導訊號。一旦酵素-受質複合物形成，則藉由反應高原的形成可觀察得到催化反應的持續進行。每個反應的發生是隨機的，這與使用單分子螢光的結果是一致的。然而，反應高原的急遽分佈指出催化遵循著精確設計的分步步驟。

【0033】 最後，特別補充本發明之實驗細節：

【0034】 (1) 實驗材料及製備方法

【0035】 ϕ 29 DNA聚合酶、T4 DNA聚合酶、T7 DNA聚合酶、以及DNA聚合酶I（大腸桿菌）是購自NEB及Invitrogen。 ϕ 29 DNA聚合酶（50 mM Tris-HCl緩衝溶液，pH 7.5，10 mM $MgCl_2$ ，10 mM $(NH_4)_2SO_4$ ，4 mM DTT）、T4 DNA聚合酶（33 mM Tris-acetate緩衝溶液，pH 7.9，66 mM sodium acetate，10 mM magnesium acetate，1 mM DTT）、T7 DNA聚合酶（20 mM Tris-HCl緩衝溶液，pH 7.5，10 mM $MgCl_2$ ，1 mM DTT）、以及DNA聚合酶I（10 mM Tris-HCl緩衝溶液，pH 7.9，50 mM NaCl，10 mM $MgCl_2$ ，1 mM

DTT) 的標準緩衝液是依照酵素建議配方所提供。實驗中所使用的緩衝溶液是稀釋1,000,000倍的標準緩衝溶液。巨觀實驗中亦同等使用稀釋的反應緩衝溶液及稀釋的鎂離子，並確認反應條件下聚合酶的酵素活性並未改變；酵素活性是藉由比較 ϕ 29 DNA聚合酶在1倍緩衝溶液下的螢光值。另外，根據單分子狀況下聚合酶在標準緩衝液稀釋 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 和 10^6 倍後的定序反應結果，亦可證明聚合酶的反應速率在緩衝溶液稀釋前後是沒有改變的。目前的單分子無標定核酸定序方法的研究成果是在稀釋的緩衝溶液中進行。

【0036】 (2) 聚合酶的接合

【0037】 使用抗老鼠的兔子免疫球蛋白抗體 (ZyMax™ Grade, Invitrogen, CA)，並將10 mM的磷酸緩衝溶液 (pH 7.4) 稀釋到最終濃度為2 mg/ml。將5 % glutaraldehyde (Sigma) 加到抗體溶液中，直到最終濃度為0.2%。0.5mg的活化抗體與1.5mg的DNA聚合酶在100 μ l的磷酸緩衝溶液中，進行25°C的反應2小時，完成接合反應。此反應藉由將磷酸緩衝溶液的總體積增加到1 ml終止。接合反應的產物藉由protein A column進行純化。上清液進一步使用高壓層析儀進行純化(Discovery BIO GFC 100 HPLC Column L x I.D. 5 cm x 4.6 mm ; Discovery R BIO GFC 100 L x I.D. 30 cm x 4.6 mm)。

【0038】 綜上所述，本發明所揭露的單分子無標定核酸定序方法，乃根據聚合酶接合到蛋白質電晶體上時所測量到的導電性去進行判讀。當核苷酸加入合成時，藉由聚合酶接合於蛋白質電晶體上所測量到的電導訊號，即能判定核酸模板之序列，此測得的電導訊號所構成之軌跡乃包含呈現明顯峰值特性的反應高原，恰可用來判別四種不同的核苷酸與對應的鹼

基，並可適用於不同的聚合酶，可用以解碼各種困難的核酸序列，其中包含20個連續的T核苷酸序列，而且，依據本發明進行定序的實驗數據中，在超過50000個核苷酸中都沒有找到一個錯誤，這表示本發明之定序方法具有非凡的準確性。另外，亦可將多組自組裝的蛋白質電晶體建構在同一晶片上，將可以同時對於多個核酸模板進行定序。

【0039】 唯以上所述者，僅為本發明之較佳實施例而已，並非用來限定本發明實施之範圍。故即凡依本發明申請範圍所述之特徵及精神所為之均等變化或修飾，均應包括於本發明之申請專利範圍內。

【符號說明】

【0040】

10	電晶體
11	源極
12	汲極
13	閘極
14	奈米通道
20、30	奈米金粒子
40	第一抗體分子
50	第二抗體分子
60	聚合酶
70	核酸模板
80	引子
90	核苷酸

100 蛋白質電晶體

申請專利範圍

1. 一種單分子無標定核酸定序方法，其步驟包含：
 - (a) 提供一蛋白質電晶體，該蛋白質電晶體包含二電極與至少二奈米金粒子，該二奈米金粒子分別結合於該二電極，且藉由施加一偏壓於該二電極，使一第一抗體分子自組裝結合至該二奈米金粒子上；
 - (b) 將一聚合酶連接於該第一抗體分子上；
 - (c) 導入一核酸模板，將一引子配對於該核酸模板上，並組裝在該聚合酶上；
 - (d) 加入一種或多種未標定的核苷酸，以與該聚合酶發生反應，並合成一互補核酸；
 - (e) 隨著(d)步驟，通過該蛋白質電晶體來同步檢測該聚合酶的複數電導訊號，以取得一電訊圖譜；及
 - (f) 根據該電訊圖譜，判定該核酸模板之序列。
2. 如請求項1所述之單分子無標定核酸定序方法，其中該蛋白質電晶體更包含一閘極，該二電極為一汲極與一源極，且該汲極與該源極之間具有一奈米通道，並藉由施加該偏壓於該閘極以提供給該汲極及該源極，而使該第一抗體分子通過該奈米通道自組裝結合至該二奈米金粒子上。
3. 如請求項1所述之單分子無標定核酸定序方法，其中該第一抗體分子係為免疫球蛋白。
4. 如請求項1所述之單分子無標定核酸定序方法，其中該聚合酶係接合於一第二抗體分子，再鍵結於該第一抗體分子上。
5. 如請求項4所述之單分子無標定核酸定序方法，其中該第二抗體分子係為

免疫球蛋白。

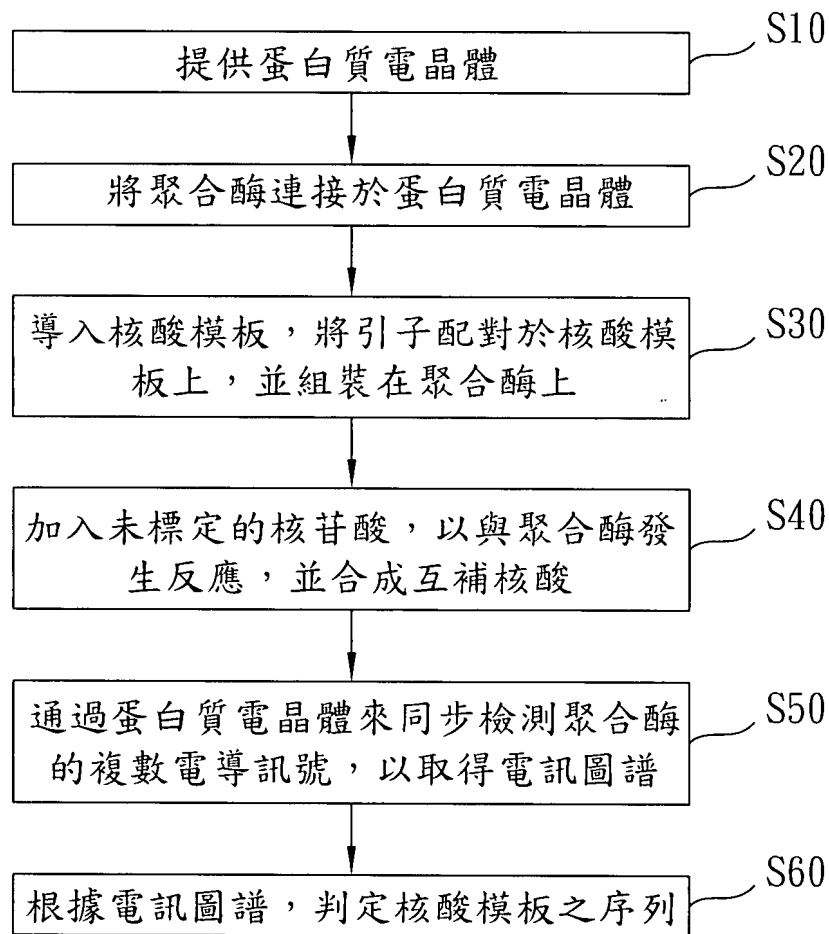
6. 如請求項1所述之單分子無標定核酸定序方法，其中該一種或多種未標定的核苷酸係為一種或多種脫氧核糖核苷三磷酸（dNTP）。
7. 如請求項6所述之單分子無標定核酸定序方法，其中該一種或多種未標定的核苷酸係選自dTTP、dATP、dCTP和dGTP。
8. 如請求項1所述之單分子無標定核酸定序方法，其中該核酸模板係為單鏈DNA（ssDNA）、雙鏈DNA（dsDNA）或RNA。
9. 如請求項1所述之單分子無標定核酸定序方法，其中該聚合酶係選自 ϕ 29 DNA聚合酶、T4 DNA聚合酶、T7 DNA聚合酶和DNA聚合酶I。
10. 如請求項1所述之單分子無標定核酸定序方法，其中該（d）步驟中，係藉由輸入高頻雷射脈衝至該聚合酶，並測量由光子誘發波動之該些電導訊號。
11. 如請求項1所述之單分子無標定核酸定序方法，其中該電訊圖譜係先呈現複數隨機突起的尖峰，再出現複數分離良好的反應高原，該些反應高原之高度約為3~6pA，藉由該些反應高原的形狀可識別該一種或多種核苷酸的種類和多種核苷酸加入的排列順序，以及與之配對的一種或多種鹼基。
12. 如請求項11所述之單分子無標定核酸定序方法，其中該一種或多種鹼基之反應高原具有高度約5~6pA之尖峰，且其中G鹼基、T鹼基和A鹼基之反應高原出現單一尖峰，而C鹼基之反應高原係出現多重的尖峰。
13. 如請求項12所述之單分子無標定核酸定序方法，其中以 Φ 29 DNA聚合酶進行定序所對應的該電訊圖譜之特性為，該G鹼基之反應高原升起後到

達尖峰之波峰的時間為 3.1 ± 0.13 毫秒，該T鹼基之反應高原升起後到達尖峰之波峰的時間為 9.3 ± 0.11 毫秒，該A鹼基之反應高原升起後到達尖峰之波峰的時間為 13.1 ± 0.14 毫秒，該C鹼基之反應高原在升起後到達第一個尖峰之波峰的時間（tsp2）為 5.2 ± 0.15 毫秒，且該C鹼基之反應高原升起後到達第二個尖峰之波峰的時間為 12.2 ± 0.12 毫秒。

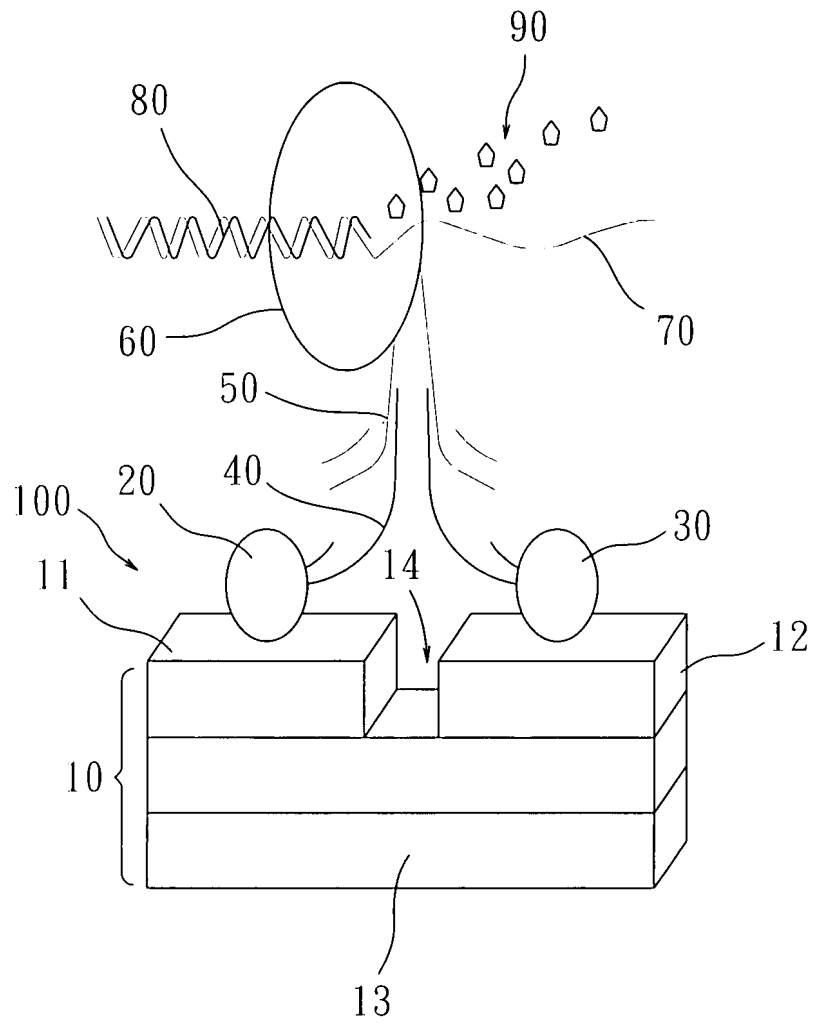
14. 如請求項12所述之單分子無標定核酸定序方法，其中以 $\Phi 29$ DNA聚合酶進行定序所對應的該電訊圖譜之特性為，該G鹼基之反應高原的寬度為 22.3 ± 2.4 毫秒，該T鹼基之反應高原的寬度為 29.5 ± 2.2 毫秒，該A鹼基之反應高原的寬度為 20.3 ± 2.1 毫秒，該C鹼基之反應高原的寬度為 30.2 ± 2.3 毫秒。
15. 如請求項12所述之單分子無標定核酸定序方法，其中以T4 DNA聚合酶進行定序所對應的該電訊圖譜之特性為，該G鹼基之反應高原的寬度為 22.2 ± 2.5 毫秒，該T鹼基之反應高原的寬度為 29.2 ± 2.4 毫秒，該A鹼基之反應高原的寬度為 20.1 ± 2.3 毫秒，該C鹼基之反應高原的寬度為 30.5 ± 2.2 毫秒。
16. 如請求項12所述之單分子無標定核酸定序方法，其中以T7 DNA聚合酶進行定序所對應的該電訊圖譜之特性為，該G鹼基之反應高原的寬度為 23.1 ± 2.3 毫秒，該T鹼基之反應高原的寬度為 26.4 ± 2.3 毫秒，該A鹼基之反應高原的寬度為 19.2 ± 2.1 毫秒，該C鹼基之反應高原的寬度為 28.3 ± 2.2 毫秒。
17. 如請求項12所述之單分子無標定核酸定序方法，其中以DNA聚合酶I進行定序所對應的該電訊圖譜之特性為，該G鹼基之反應高原的寬度為 20.1 ± 2.4 毫秒，該T鹼基之反應高原的寬度為 25.4 ± 2.4 毫秒，該A鹼基之反應高原的寬度為 26.2 ± 2.3 毫秒，該C鹼基之反應高原的寬度為 33.2 ± 2.6 毫秒。

- 18.如請求項12所述之單分子無標定核酸定序方法，其中該T鹼基和該C鹼基之反應高原的寬度係長於該G鹼基和該A鹼基之反應高原的寬度。
- 19.如請求項12所述之單分子無標定核酸定序方法，其中在該A鹼基和該C鹼基之反應高原的寬度以及形狀係在反應高原的最後尖峰出現之後產生變化。
- 20.如請求項1所述之單分子無標定核酸定序方法，其中該蛋白質電晶體係為複數組，並設置於同一晶片上，用以分別對於複數核酸模板進行定序。

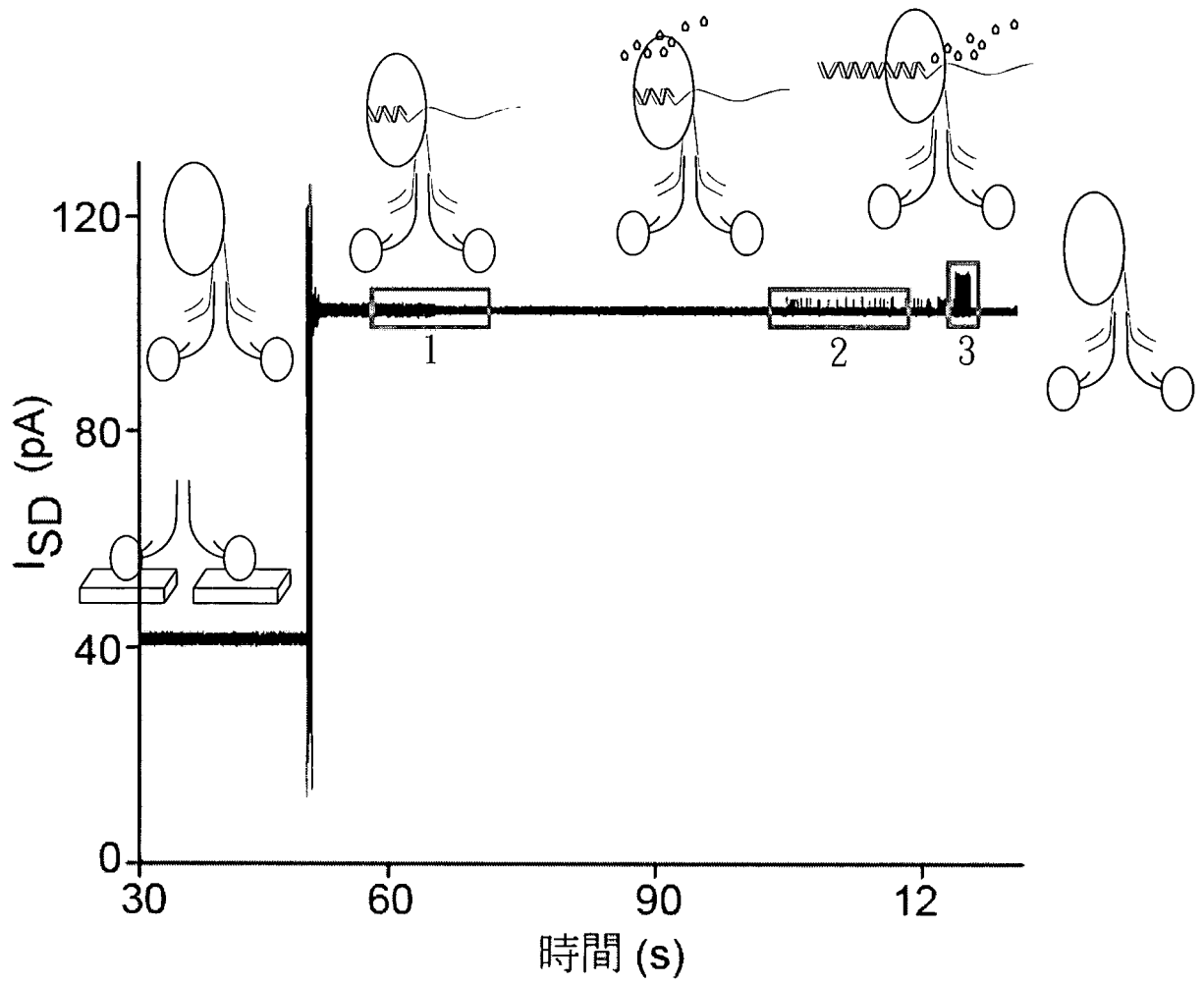
圖式



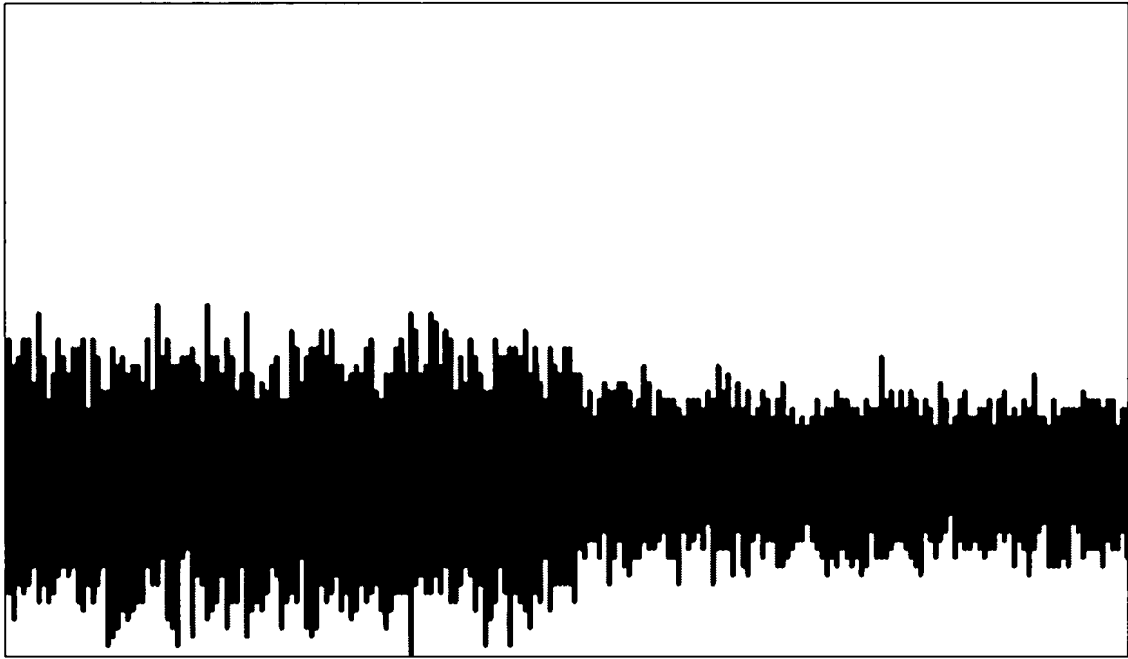
第 1 圖



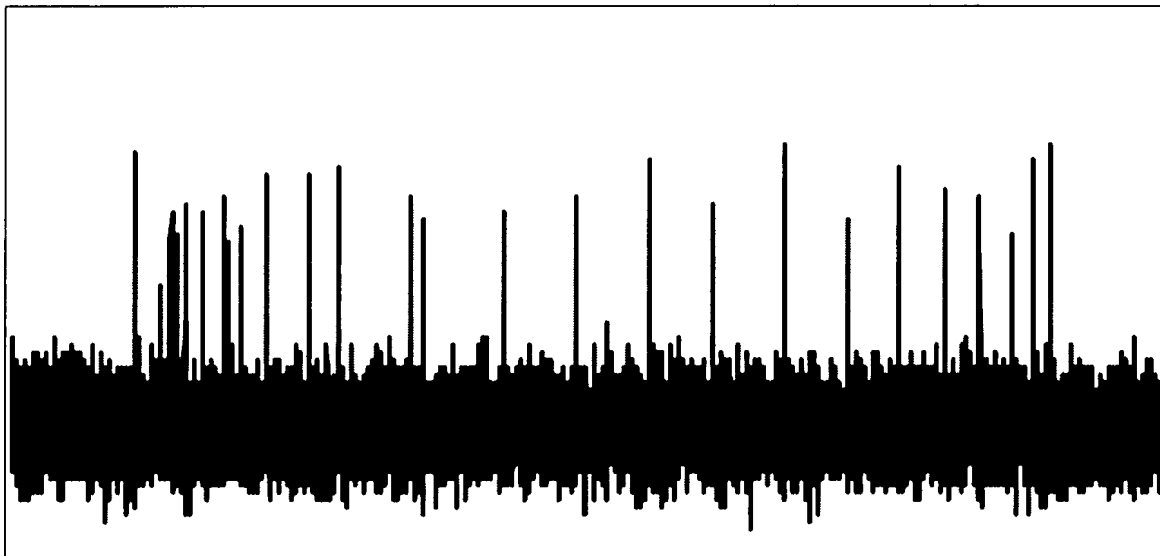
第 2 圖



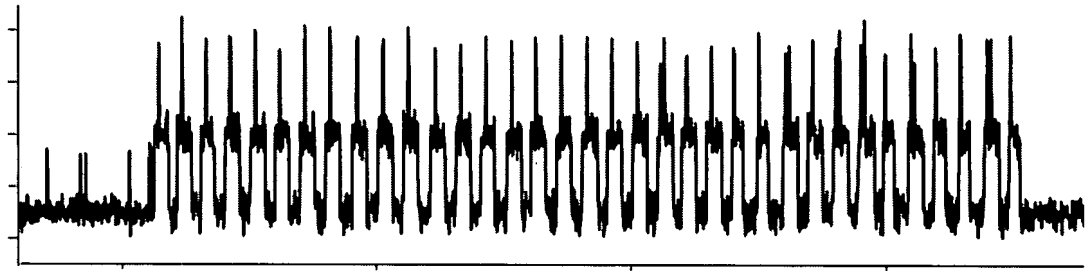
第 3a 圖



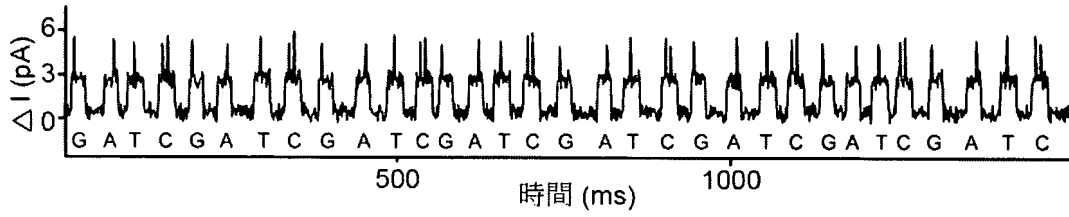
第 3a-1 圖



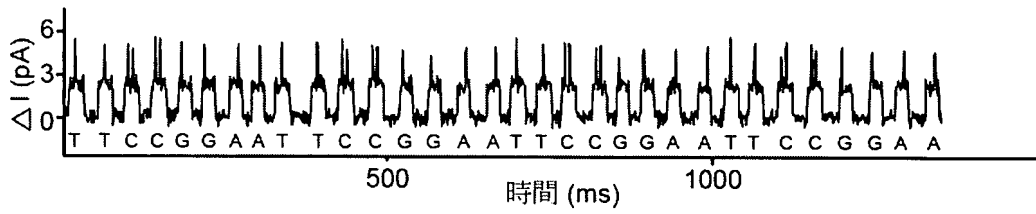
第 3a-2 圖



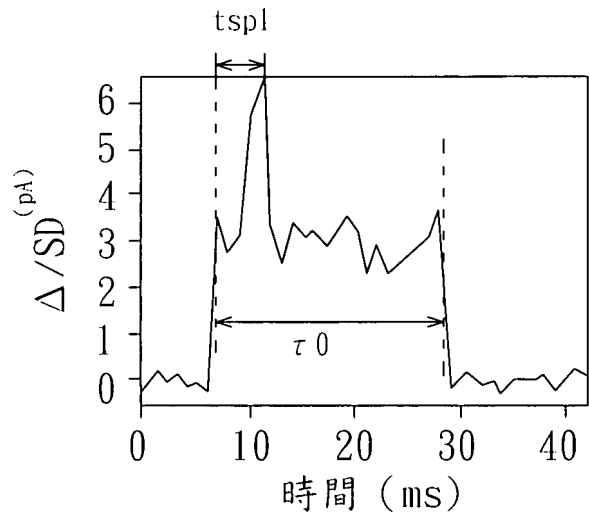
第 3a-3 圖



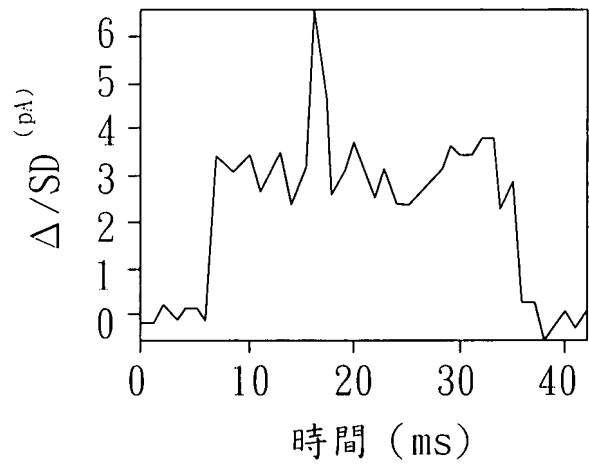
第 3b 圖



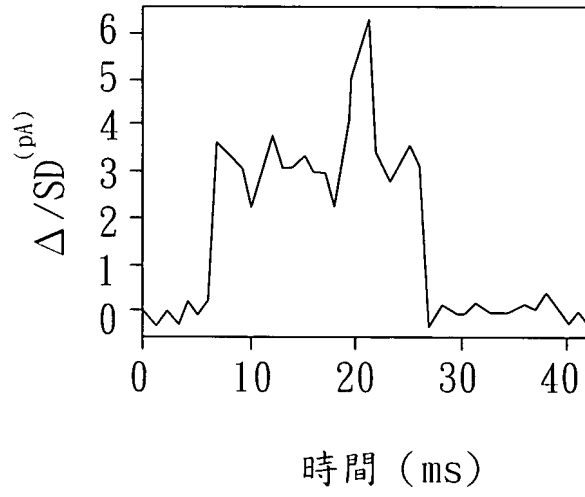
第 3c 圖



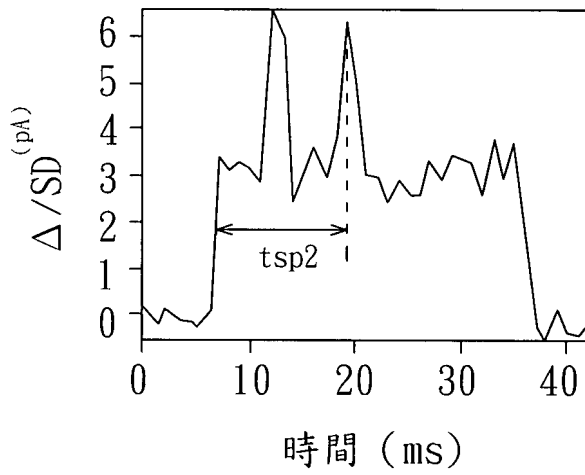
第 4a 圖



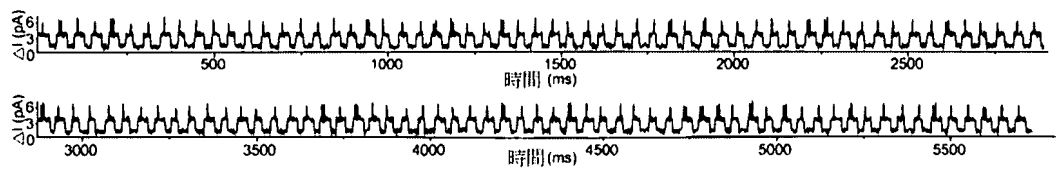
第 4b 圖



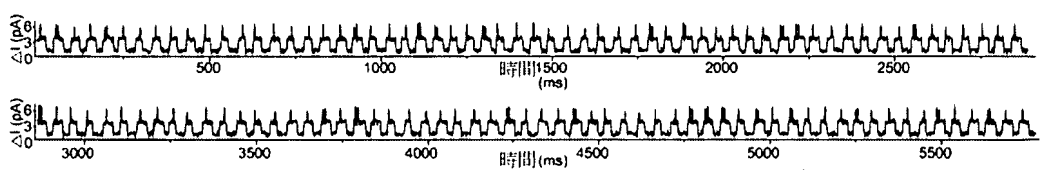
第 4c 圖



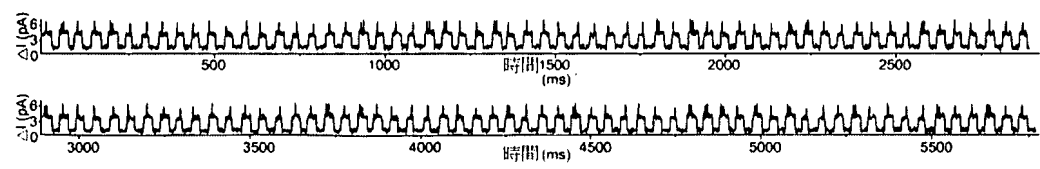
第 4d 圖



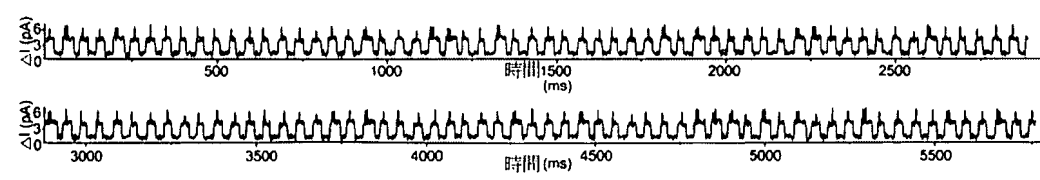
第 5a 圖



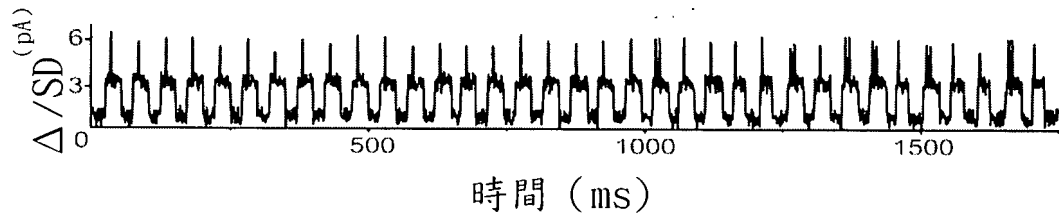
第 5b 圖



第 5c 圖



第 5d 圖



第 6 圖